



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0026588

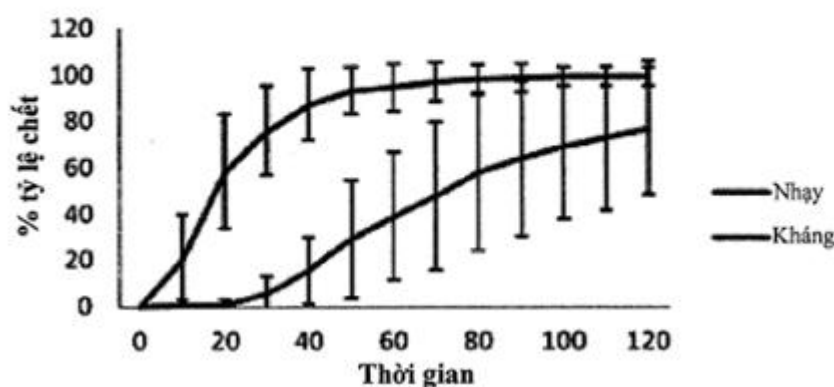
(51)⁷ A01N 25/08; A01N 53/00; A01P 7/04; (13) B
A01N 37/02

(21) 1-2016-01536 (22) 02/10/2014
(86) PCT/US2014/058811 02/10/2014 (87) WO 2015/051109 09/04/2015
(30) 61/885,754 02/10/2013 US
(45) 25/12/2020 393 (43) 25/10/2016 343A
(73) Valent Biosciences Corporation (US)
870 Technology Way, Libertyville, IL 60048, United States of America
(72) BELKIND, Benjamin, A. (US); CLARK, Jason (US); DECHANT, Peter (US).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) HỖN HỢP DIỆT LOÀI GÂY HẠI CHỨA AXIT BÉO OCTANOIC, NONANOIC VÀ DECANOIC VỚI PYRETHROIT, VÀ PHƯƠNG PHÁP KHỐNG CHẾ CÔN TRÙNG NHỜ SỬ DỤNG HỖN HỢP NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến hỗn hợp của các axit béo octanoic, nonanoic và decanoic (C8, 9, 10) với pyrethroit. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sử dụng hỗn hợp các axit béo octanoic, nonanoic và decanoic (C8, 9, 10) và pyrethroit để đạt được tác dụng khống chế động vật chân khớp vượt trội hơn.

Đáp ứng thời gian/tỷ lệ chết của *Aedes aegypti* nhạy và kháng đối với Permethrin trong thử nghiệm sinh học sử dụng chai



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hỗn hợp chứa axit béo octanoic, nonanoic và decanoic và pyrethroit.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Động vật chân khớp, như muỗi, thường gây phiền toái cho người và các động vật khác. Động vật chân khớp cũng có thể là vật truyền bệnh. Do mỗi phiền toái này và các vấn đề sức khỏe cộng đồng, con người cố gắng không chế quần thể động vật chân khớp gần môi trường sống của mình. Một cách không chế động vật chân khớp là bằng cách sử dụng pyrethroit.

Pyrethroit là chất gây tổn hại thần kinh sợi trục, ngăn chặn việc đóng kênh natri cổng điện áp trong màng sợi trục của động vật chân khớp. Chất độc này hoạt động bằng cách làm tê liệt sinh vật.

Mặc dù pyrethroit là thuốc diệt động vật chân khớp trưởng thành hiệu quả, nhưng vấn đề chính là ở chỗ quần thể động vật chân khớp đang phát triển tính kháng đối với thuốc này. Tính kháng pyrethroit, gây ra bởi enzym khử độc đặc hiệu hoặc cơ chế vị trí đích thay đổi (đột biến kiểu Jcdr trong kênh natri), đã được báo cáo trên hầu hết các lục địa ở phần lớn các loài muỗi quan trọng về mặt y tế. Nếu việc kháng thuốc tiếp tục phát triển và lan rộng với tốc độ như hiện nay, thì nó có thể làm cho thuốc diệt côn trùng ở dạng hiện nay không hiệu quả. Viễn cảnh này sẽ tiềm ẩn nguy cơ cho sức khỏe cộng đồng, vì vẫn chưa có các chất thay thế rõ ràng cho nhiều pyrethroit.

Kháng thuốc là hiện tượng phức tạp phát sinh từ việc nhiều thể hệ côn trùng tiếp xúc với cùng nhóm thuốc diệt côn trùng hoặc nhóm thuốc diệt côn trùng tương tự trong một khoảng thời gian dài. Hiện tượng kháng thuốc phát triển do sự tiêu diệt các cá thể nhạy trong quần thể và sự sống sót kèm theo sinh

sản sau đó của các cá thể vốn đã “miễn dịch” với tác động của thuốc diệt côn trùng. Việc kháng thuốc có thể còn là do nhiều yếu tố bao gồm việc chọn lọc các đột biến ở vị trí mong muốn, enzym khử độc và tính thấm biểu bì giảm. Việc kháng thuốc có thể phát sinh trong quần thể tự nhiên mà trước đây đã được xác định là nhạy với thuốc diệt côn trùng hoặc trong quần thể đã tiếp xúc với thuốc diệt côn trùng thuộc nhóm khác hoặc nhóm tương tự hoặc cơ chế tác động khác hoặc tương tự. Có thể xuất hiện tính kháng chéo và, ngoài tính kháng sinh lý, cơ chế kháng tập tính cũng có thể có mặt. Kết quả là, do tính kháng đối với các biện pháp khống chế hiện nay, thuốc diệt côn trùng sẵn có thường không đủ tạo ra tỷ lệ gây chết cần để đạt được mức độ khống chế động vật chân khớp hợp lý ở mức sử dụng chấp nhận được đối với môi trường. Vì côn trùng kháng pyrethroid gây nguy cơ đáng kể cho sức khỏe con người, nên trong lĩnh vực này có nhu cầu về thuốc diệt côn trùng động vật chân khớp an toàn và hiệu quả.

Một loại động vật chân khớp là mối lo âu chính đối với sức khỏe con người là muỗi. Ba giống muỗi truyền bệnh chính là *Anopheles*, *Culex* và *Aedes*. Do đó, có nhu cầu khống chế muỗi để làm giảm khả năng truyền bệnh.

Thuốc diệt côn trùng có thể tấn công giai đoạn bất kỳ trong quá trình phát triển của côn trùng. Tuy nhiên, muỗi trong giai đoạn trưởng thành truyền virus và vật ký sinh gây bệnh. Việc khống chế giai đoạn ấu trùng là tuyến phòng thủ đầu tiên để ngăn chặn quần thể muỗi, nhưng không có khả năng khống chế muỗi trưởng thành, nên khả năng kiểm soát bệnh có thể bị giảm nghiêm trọng trong nhiều trường hợp.

Trước đây, vấn đề kháng thuốc diệt côn trùng đã được giải quyết bằng cách dùng luân phiên các thuốc diệt côn trùng thông thường có cấu trúc hóa học khác nhau. Tuy nhiên, tính kháng đa cấu trúc hóa học đã phát triển trong nhiều trường hợp, làm phức tạp phương pháp này. Do đó, cần có phương pháp mới khắc phục được tính kháng thuốc diệt côn trùng.

Patent Mỹ số 6,306,415 đề cập đến phương pháp đuổi ruồi bằng cách áp dụng tại chỗ chế phẩm chứa axit octanoic, axit nonanoic và axit decanoic với tỷ

lệ 1:1:1 làm các hoạt chất duy nhất. Patent Mỹ số 6,444,216 đề cập đến chế phẩm và phương pháp xua đuổi côn trùng chứa hỗn hợp các axit béo làm hoạt chất duy nhất. Các patent này không bàn luận về khả năng sử dụng các hợp chất này kết hợp với pyrethroid.

McAllister, et al., Mode of Action for Natural Products Isolated from Essential Oils of Two Trees is Different From Available Mosquito Adulticides, J. Med. Entomol. 47(6): 1123-1126, bàn luận về khả năng sử dụng thymoquinon, nootkaton, và carvacrol để xử lý các chủng muỗi kháng pyrethroid, nhưng không bàn luận về khả năng sử dụng các hợp chất này kết hợp với pyrethroid.

Các chế phẩm đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này không tạo ra thuốc diệt côn trùng trưởng thành an toàn với môi trường, hiệu quả trên động vật chân khớp kháng pyrethroid và nhạy pyrethroid.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hỗn hợp diệt loài gây hại chứa lượng hữu hiệu của axit béo octanoic, nonanoic và decanoic (C8, 9, 10) và lượng hữu hiệu của pyrethroid.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp khống chế côn trùng bao gồm bước sử dụng cho môi trường cần khống chế côn trùng lượng hữu hiệu của hỗn hợp theo sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1: Đáp ứng thời gian/tỷ lệ chết của *Aedes aegypti* nhạy và kháng với Permethrin trong Thử nghiệm sinh học sử dụng chai, là đồ thị thể hiện các kết quả từ Thử nghiệm sinh học sử dụng chai trong Ví dụ #1. Thử nghiệm sinh học này xác nhận rằng chủng *Aedes aegypti* kháng pyrethroid.

FIG. 2: Đáp ứng thời gian/tỷ lệ chết của *Aedes aegypti* nhạy và kháng với C8910 trong Thử nghiệm sinh học sử dụng chai, là đồ thị thể hiện các kết quả từ Thử nghiệm sinh học sử dụng chai trong Ví dụ #2. Thử nghiệm sinh học

này chứng tỏ rằng *Aedes aegypti* kháng pyrethroit và nhạy pyrethroit có đáp ứng tương đương với hỗn hợp chứa axit béo C8, 9, 10.

FIG. 3: Đáp ứng thời gian/tỷ lệ chết của *Aedes aegypti* nhạy và kháng với hỗn hợp của C8910 với Permethrin tỷ lệ 1:0,01 trong Thử nghiệm sinh học sử dụng chai, là đồ thị thể hiện các kết quả từ Thử nghiệm sinh học sử dụng chai trong Ví dụ #3. Thử nghiệm sinh học này chứng tỏ rằng *Aedes aegypti* kháng pyrethroit có đáp ứng nhanh hơn so với *Aedes aegypti* nhạy pyrethroit đối với hỗn hợp chứa axit béo C8, 9, 10 với pyrethroit, như permethrin.

Mô tả chi tiết sáng chế

Tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng hỗn hợp chứa axit octanoic, nonanoic và decanoic (C8, 9, 10) với pyrethroit tạo ra chất diệt côn trùng có hiệu quả cao chống lại muỗi trưởng thành. Ngoài ra, hỗn hợp theo sáng chế hạ gục nhanh côn trùng, và cho tỷ lệ gây chết cao.

Bất ngờ là, hỗn hợp chứa các axit béo octanoic, nonanoic và decanoic (C8, 9, 10) với pyrethroit không chế muỗi kháng pyrethroit vượt trội hơn. Điều này là bất ngờ vì người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này đã không thể dự đoán rằng muỗi đã kháng pyrethroit sẽ bị chết do tiếp xúc với pyrethroit khi có mặt axit béo octanoic, nonanoic và decanoic. Patent Mỹ số 6,306,415 và 6,444,216, như được giải thích trên đây, đề cập đến việc xua đuổi côn trùng bằng axit béo nhưng không đề cập đến tỷ lệ gây chết tăng. Do đó, sẽ không dự đoán được rằng côn trùng bị tiêu diệt bằng hỗn hợp của hợp chất mà côn trùng này đã phát triển tính kháng và chất xua đuổi.

Ngoài ra, hỗn hợp theo sáng chế tạo ra tỷ lệ tiêu diệt các loài nhạy pyrethroit cao hơn so với khi sử dụng một mình pyrethroit. Cũng không dự đoán được rằng chất xua đuổi, axit béo octanoic, nonanoic và decanoic (C8, 9, 10), sẽ làm tăng tỷ lệ tiêu diệt của pyrethroit.

Như được sử dụng ở đây, “hỗn hợp các axit béo” và “hỗn hợp chứa các axit béo” chỉ hỗn hợp của axit octanoic, nonanoic và decanoic. Hỗn hợp này cũng được gọi là “C8, 9, 10” và “C8910” trong bản mô tả này. Octanoic, hoặc

axit caprylic, là axit béo no có tám cacbon. Axit nonanoic, hoặc axit pelargonic, là axit béo no có chín cacbon. Axit decanoic, hoặc axit capric, là axit béo no có mười cacbon. Hỗn hợp các axit béo được sử dụng trong hỗn hợp theo sáng chế là có sẵn từ Emery Oleochemicals. Hỗn hợp các axit béo có phần trăm khối lượng mỗi axit béo bằng nhau (khoảng 33,3% mỗi loại).

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến hỗn hợp diệt loài gây hại chứa lượng hữu hiệu của hỗn hợp các axit béo và lượng hữu hiệu của pyrethroit.

Theo phương án khác, hỗn hợp các axit béo chứa khoảng 33% axit béo octanoic, khoảng 33% axit béo nonanoic, và khoảng 33% axit béo decanoic.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến hỗn hợp trong đó pyrethroit là permethrin.

Các pyrethrin tự nhiên và các pyrethroit khác có thể được sử dụng trong hỗn hợp theo sáng chế. Các pyrethoit này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các chất đồng phân lập thể Allethrin, Bifenthrin, Beta-Cyfluthrin, Cyfluthrin, Cypermethrin, d,d,trans-Cyphenothrin, Cyphenothrin, Deltamethrin, Esfenvalerat, Etofenprox Fenpropathrin, Tau-Fluvalinat, Lambda-Cyhalothrin, Gama Cyhalothrin, Imiprothrin, 1RS cis-Permethrin, Permethrin, Prallethrin, Resmethrin, Sumithrin (d-phenothrin), Tefluthrin, Tetramethrin, Tralomethrin, và Zeta-Cypermethrin.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến hỗn hợp trong đó hỗn hợp các axit béo và pyrethroit có tỷ lệ nằm trong khoảng từ khoảng 1000:1 đến khoảng 1:1000 theo khối lượng. Sáng chế cũng đề cập đến hỗn hợp trong đó hỗn hợp các axit béo và pyrethroit có tỷ lệ nằm trong khoảng từ khoảng 100:1 đến khoảng 1:100 theo khối lượng. Theo các phương án được ưu tiên, tỷ lệ này là từ khoảng 20:1 đến khoảng 1:20 theo khối lượng. Theo phương án được ưu tiên hơn, tỷ lệ này là khoảng 1:1 hoặc khoảng 1:2 theo khối lượng.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp khống chế côn trùng bao gồm bước sử dụng cho môi trường cần khống chế côn trùng lượng

hữu hiệu của hỗn hợp được mô tả trên đây bằng cách phun vào không gian của môi trường. Theo một phương án, phun vào không gian của môi trường có thể là phun sol khí hoặc phun mù nhiệt. Theo một phương án, môi trường là diện tích bên trong hoặc ngoài trời ở đó động vật chân khớp trưởng thành có mặt, gần vị trí phát triển của muỗi, diện tích ngoài trời xung quanh nơi ở của người, và diện tích bên trong nơi ở của người, như nhà ở, kết cấu hoặc tòa nhà thương mại, hoặc cây trồng nông nghiệp.

Theo một phương án, hỗn hợp theo sáng chế có thể được sử dụng bằng cách phun hoặc quét hỗn hợp lên trên bề mặt. Sáng chế cũng có thể được áp dụng bằng cách phun tồn dư. Nếu hỗn hợp được sử dụng dưới dạng phun vào không gian của môi trường, tỷ lệ của hỗn hợp các axit béo so với pyrethroid có thể là từ khoảng 1:10 đến khoảng 10:1 theo khối lượng. Theo phương án được ưu tiên, chế phẩm được áp dụng ở tỷ lệ khoảng 1:1 hoặc khoảng 1:2. Nếu hỗn hợp được áp dụng dưới dạng xử lý tiếp xúc (tồn dư hoặc trên vải đã được xử lý), có thể sử dụng tỷ lệ nằm trong khoảng từ khoảng 1:100 đến khoảng 1:10,000 theo khối lượng, và tốt hơn là ở tỷ lệ khoảng 1:100 theo khối lượng.

Theo phương án khác, động vật chân khớp là động vật được khống chế. Ví dụ về động vật chân khớp có thể được khống chế bởi hỗn hợp theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, côn trùng, rết, động vật nhiều chân và nhện.

Theo phương án khác, động vật chân khớp được khống chế có khả năng kháng pyrethroid.

Theo phương án được ưu tiên, muỗi được khống chế. Theo phương án được ưu tiên hơn, muỗi thuộc loài *Aedes aegypti* được khống chế.

Theo phương án khác, hỗn hợp theo sáng chế tạo ra sự khống chế động vật chân khớp ban đầu. Theo phương án khác, hỗn hợp theo sáng chế tạo ra sự khống chế động vật chân khớp tồn dư.

Theo một phương án, hỗn hợp theo sáng chế có thể được áp dụng cho vải. Vải này có thể ở dạng màn, lều hoặc mặt hàng quần áo.

Hỗn hợp theo sáng chế có thể được phối trộn theo công thức để tạo ra sản phẩm hiệu quả hoặc ổn định hơn khi bảo quản. Hỗn hợp theo sáng chế có thể được pha loãng thêm để sử dụng.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp sử dụng hỗn hợp theo sáng chế để không chế côn trùng. Phương pháp áp dụng chế phẩm theo sáng chế được ưu tiên là bằng cách phun, chải, hoặc các biện pháp khác dùng để phân phối sản phẩm lỏng đến môi trường cần xử lý. Hiện nay, phương pháp áp dụng được ưu tiên nhất là áp dụng bằng cách phun vào không gian của môi trường hoặc phun hoặc chải lượng hữu hiệu của chế phẩm lên trên bề mặt.

Hỗn hợp theo sáng chế có thể được áp dụng cho môi trường bất kỳ cần khống chế côn trùng. Môi trường cần khống chế côn trùng có thể bao gồm diện tích bất kỳ mong muốn không có sự lan nhiễm côn trùng. Ví dụ, chế phẩm có thể được áp dụng cho môi trường như diện tích ngoài trời gần vị trí phát triển của muỗi, diện tích ngoài trời xung quanh nơi ở của người, diện tích bên trong nơi ở của người như nhà ở hoặc các tòa nhà thương mại, kể cả nhà ở của từng hộ gia đình, khách sạn, nhà trông trẻ, thư viện, khu nhà ở của nhiều hộ gia đình, nhà giam, ký túc xá, phòng tắm, tiền sảnh, kể cả khách sạn, và bệnh viện, hoặc phương tiện vận chuyển. Môi trường cũng có thể là vải và hỗn hợp có thể được áp dụng cho vải như len và quần áo. Môi trường cũng có thể là cây trồng nông nghiệp cần bảo vệ.

Các phương án đã được bộc lộ chỉ là các phương án minh họa sáng chế và không được xem là giới hạn phạm vi của sáng chế.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, tất cả các trị số liên quan đến lượng, phần trăm khối lượng và các trị số tương tự được xác định là “khoảng” hoặc “xấp xỉ” mỗi giá trị cụ thể, cụ thể là, cộng hoặc trừ 10%. Ví dụ, cụm từ “ít nhất 5% theo khối lượng” cần được hiểu là “ít nhất 4,5% đến 5,5% theo khối lượng.” Do đó, lượng trong khoảng 10% trị số được yêu cầu bảo hộ sẽ được bao hàm trong phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ.

Thuật ngữ “lượng hữu hiệu” nghĩa là lượng của chế phẩm sẽ tiêu diệt côn trùng đích. “Lượng hữu hiệu” sẽ thay đổi tùy thuộc vào nồng độ hỗn hợp,

loại côn trùng cần được xử lý, mức độ nghiêm trọng của sự lan nhiễm côn trùng, kết quả mong muốn, và giai đoạn sống của côn trùng trong quá trình xử lý, trong số các yếu tố khác. Do đó, không phải lúc nào cũng có thể định rõ “lượng hữu hiệu” một cách chính xác. Tuy nhiên, “lượng hữu hiệu” thích hợp trong trường hợp riêng rẽ bất kỳ có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một phương án, lượng hữu hiệu có thể lên đến 40% của C8, 9, 10 và 40% của pyrethroit. Theo phương án được ưu tiên, lượng hữu hiệu có thể là từ khoảng 1% đến khoảng 40% của C8, 9, 10 và từ khoảng 1% đến khoảng 40% của pyrethroit. Hỗn hợp này có thể được phối trộn theo công thức với tá dược, như dung môi, chất chống đóng bánh, chất làm ổn định, chất khử bọt, chất trượt, chất làm ẩm, chất phân tán, chất thấm ướt, chất làm đặc, chất nhũ hóa, chất thấm, tá dược, chất hiệp đồng, và/hoặc chất bảo quản.

Các ví dụ sau được dự định để minh họa sáng chế và chỉ dẫn cho người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này cách sử dụng chế phẩm theo sáng chế. Các ví dụ này không được dự định làm giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Các chế phẩm

Điều chế hỗn hợp axit béo octanoic, nonanoic và decanoic (C8, 9, 10) và permethrin.

Trước tiên, 1% permethrin trong dung dịch axeton được pha chế, Dung dịch I. Sau đó, dung dịch này được sử dụng để pha chế các dung dịch permethrin khác nhau trong Dung dịch II và III. Butyl Hydroxy Toluen (“BHT”) được sử dụng làm chất chống oxy hóa. Sau đó, dung dịch I, II, và III được trộn với C8, 9, 10 như được giải thích dưới đây.

Bảng 1

	Dung dịch I 1% Permethrin	% khối lượng	Thứ tự bổ sung
Thành phần chế phẩm			
Permethrin	1,2	1,0000%	1
Axeton	118,3	98,6%	2
BHT	0,5	0,4%	3
Tổng khối lượng	120,00	100%	

Bảng 2

	Dung dịch II 0,1% Permethrin	% khối lượng	Thứ tự bổ sung
Thành phần chế phẩm			
Dung dịch I	12,5	10,0000%	1
Axeton	112	89,6000%	2
BHT	0,5	0,4000%	3
Tổng khối lượng	125,00	100%	

Bảng 3

	Dung dịch III 0,01% Permethrin	% khối lượng	Thứ tự bổ sung
Thành phần chế phẩm			
Dung dịch II	20	10,0000%	1
Axeton	179,2	89,6000%	2
BHT	0,8	0,4000%	3
Tổng khối lượng	200,00	100%	

Pha chế 1% permethrin trong axeton (Dung dịch I; Bảng 1):

Các thành phần trên đây được cân và chuyển vào chai dung tích 250 mL có lắp cánh khuấy từ theo thứ tự bổ sung nêu trong bảng trên đây. Chai được đậy kín và hỗn hợp trong chai được khuấy bằng cách sử dụng khuấy từ cho đến khi BHT được hòa tan hoàn toàn.

Pha chế 0,1% permethrin trong axeton (Dung dịch II; Bảng 2):

Các thành phần trên đây được cân và chuyển vào chai dung tích 250 mL có lắp cánh khuấy từ theo thứ tự bổ sung nêu trong bảng trên đây. Chai được

đậy kín và hỗn hợp trong chai được khuấy bằng cách sử dụng khuấy từ cho đến khi BHT được hòa tan hoàn toàn.

Pha chế 0,01% permethrin trong axeton (Dung dịch III; Bảng 3):

Các thành phần trên đây được cân và chuyển vào chai dung tích 250 mL có lắp cánh khuấy từ theo thứ tự bổ sung nêu trong bảng trên đây. Chai được đậy kín và hỗn hợp trong chai được khuấy bằng cách sử dụng khuấy từ cho đến khi BHT được hòa tan hoàn toàn.

Pha chế 1% C8, 9, 10 + 1% permethrin trong axeton:

C8, 9, 10, 0,5g, được cân và chuyển vào chai dung tích 100 mL. Sau đó, dung dịch I (Bảng 1), 49,5 g, được bổ sung vào chai. Chai được đậy kín và hỗn hợp trong chai được lắc cho đến khi đồng nhất.

Pha chế 1% C8, 9, 10 + 0,1% permethrin trong axeton:

C8, 9, 10, 0,5g, được cân và chuyển vào chai dung tích 100 mL. Sau đó, dung dịch II (Bảng 2), 49,5 g, được bổ sung vào chai. Chai được đậy kín và hỗn hợp trong chai được lắc cho đến khi đồng nhất.

Pha chế 1% C8, 9, 10 + 0,01% permethrin trong axeton:

C8, 9, 10, 0,5g, được cân và chuyển vào chai dung tích 100 mL. Sau đó, dung dịch III (Bảng 3), 49,5 g, được bổ sung vào chai. Chai được đậy kín và hỗn hợp trong chai được lắc cho đến khi đồng nhất.

Pha chế 1% C8, 9, 10 + 0,001% permethrin trong axeton:

C8, 9, 10, 0,5g, được cân và chuyển vào chai dung tích 100 mL được lắp thiết bị khuấy từ. Sau đó, dung dịch III (Bảng 3), 5g, được bổ sung vào chai, sau đó là 44,3 g axeton, và 0,2g BHT. Chai được đậy kín và hỗn hợp trong chai được khuấy từ cho đến khi toàn bộ BHT đều đã hòa tan.

Ví dụ 2

Thử nghiệm sinh học sử dụng chai

Các thử nghiệm sinh học sau được thực hiện để xác định xem *Aedes aegypti* nhạy pyrethroid và kháng pyrethroid đáp ứng như thế nào khi tiếp xúc với permethrin và hỗn hợp các axit béo, theo cách riêng rẽ và khi kết hợp. Phương pháp Thử nghiệm sinh học sử dụng chai chuẩn của Trung tâm kiểm soát và phòng ngừa dịch bệnh (Centers for Disease Control (“CDC”)) được sử dụng. Thử nghiệm được tiến hành ở Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (“CIDEIM”) ở Colombia trên *Aedes aegypti* nhạy và kháng thuốc. Các hợp chất được pha loãng trong axeton, được bổ sung vào các chai, và các chai được cuộn để bao chúng bên trong cho đến khi khô. Muỗi nhạy và muỗi kháng thuốc được tiếp xúc bên trong các chai đã được xử lý.

Thử nghiệm sinh học sử dụng chai đánh giá độ nhạy bằng cách xác định thời gian chết của muỗi được tiếp xúc trong các chai đã được phủ bên trong bằng “nồng độ chuẩn đoán” của hợp chất thử nghiệm. Muỗi kháng sẽ bị tác động do tiếp xúc với nguyên liệu này lâu hơn đáng kể so với muỗi nhạy, dẫn đến đường cong thời gian/tỷ lệ chết khác nhau.

Thử nghiệm sinh học sử dụng chai #1

Trong Thử nghiệm sinh học sử dụng chai này, muỗi kháng pyrethroid và muỗi nhạy pyrethroid được cho tiếp xúc với permethrin. Như có thể thấy được trên Fig.1, muỗi nhạy pyrethroid có tỷ lệ chết khi tiếp xúc với permethrin cao hơn so với muỗi nhạy. Muỗi nhạy có tỷ lệ chết gần như 100% sau khoảng 80 phút. Trong nghiên cứu này, n=5, khoảng LT là 95% CI, và các thanh sai số là độ lệch chuẩn.

Bảng 4

Chủng	LT50 (phút)	LT99 (phút)
Nhạy	18,8	99,3
Kháng	73,5	306,7

Thử nghiệm sinh học sử dụng chai #2

Trong Thử nghiệm sinh học sử dụng chai này, muỗi kháng pyrethroid và muỗi nhạy pyrethroid được cho tiếp xúc với hỗn hợp các axit béo octanoic,

nonanoic và decanoic. Như có thể thấy được trên Fig.2, muỗi nhạy permethrin và muỗi kháng permethrin có đáp ứng tương đương nhau khi được cho tiếp xúc với hỗn hợp các axit béo octanoic, nonanoic và decanoic. Cả hai nhóm đều nhạy khi được cho tiếp xúc với hỗn hợp các axit béo octanoic, nonanoic và decanoic (C8, 9, 10). Trong nghiên cứu này, $n=5$, khoảng LT là 95% CI, và các thanh sai số là độ lệch chuẩn.

Bảng 5

Chủng	LT50 (phút)	LT99 (phút)
Nhạy	13,3	187
Kháng	13,4	189

Thử nghiệm sinh học sử dụng chai #3

Trong Thử nghiệm sinh học sử dụng chai này, muỗi kháng pyrethroid và muỗi nhạy pyrethroid được cho tiếp xúc với hỗn hợp của hỗn hợp các axit béo octanoic, nonanoic và decanoic (C8, 9, 10) và permethrin. Như có thể thấy được trên FIG.3, muỗi kháng permethrin có đáp ứng nhanh hơn so với muỗi nhạy khi được cho tiếp xúc với hỗn hợp này (tỷ lệ chết của muỗi kháng thuốc được thể hiện bằng đường nằm trên đường sẫm màu). Cả hai nhóm đều nhạy khi được cho tiếp xúc với hỗn hợp này. Trong nghiên cứu này, $n=5$, khoảng LT là 95% CI, và các thanh sai số là độ lệch chuẩn.

Bảng 6

Chủng	LT50 (phút)	LT99 (phút)
Nhạy	5,3	22,9
Kháng	3,2	13,4

Ví dụ 3

Thử nghiệm sinh học tại chỗ

Các thử nghiệm sinh học tại chỗ sau được thực hiện để xác định xem *Aedes aegypti* nhạy pyrethroid và kháng pyrethroid đáp ứng như thế nào khi tiếp xúc với permethrin và hỗn hợp các axit béo, theo cách riêng rẽ và khi kết hợp. Phương pháp thử nghiệm sinh học tại chỗ chuẩn của Tổ chức y tế thế giới

(“WHO”) được sử dụng. Thử nghiệm được tiến hành ở CIDEIM với *Aedes aegypti* nhạy thuốc và kháng thuốc. Các hợp chất được pha loãng trong axeton, và 1ul được áp dụng cho đốt ngực trước của muỗi được gây mê bằng CO₂ (nhóm 20 – lặp lại 3 lần).

Thử nghiệm sinh học tại chỗ tập trung vào nồng độ phần trăm tạo ra tỷ lệ chết tại thời điểm 24 giờ, nhưng cũng có thể đánh giá độ nhạy bằng cách xác định thời gian chết của muỗi được tiếp xúc ở các nồng độ khác nhau. Các thử nghiệm tại chỗ là thước đo công hiệu tiềm năng khi được áp dụng dưới dạng phun vào không gian của môi trường gần đúng hơn so với các thử nghiệm trong chai, vì muỗi nhận được liều mà chúng không thể tránh được (tương tự với phun nhỏ giọt).

Thử nghiệm tại chỗ #1

Trong Thử nghiệm sinh học này, muỗi kháng pyrethroid và muỗi nhạy pyrethroid được cho tiếp xúc với tỷ lệ 1:1 của hỗn hợp các axit béo C8, 9, 10 và permethrin. Như có thể được thấy trong Bảng 7, muỗi nhạy permethrin và muỗi kháng permethrin có đáp ứng tương đương nhau khi được cho tiếp xúc với hỗn hợp này. Cả hai nhóm đều nhạy khi được cho tiếp xúc với hỗn hợp ở tỷ lệ này.

Bảng 7

Phần trăm sống sót của *Aedes aegypti* kháng và nhạy theo thời gian trong thử nghiệm tại chỗ của C8910 và Permethrin (1% và 1%)

Chủng	Thời gian (phút trừ khi được lưu ý khác đi)						
	10	20	30	40	50	60	24 giờ
Nhạy	36,7	4,2	5,0	3,5	3,2	1,5	1,5
Kháng	11,5	3,5	2,2	2,4	2,2	1,7	0

Thử nghiệm tại chỗ #2

Trong Thử nghiệm sinh học này, muỗi kháng pyrethroid và muỗi nhạy pyrethroid được cho tiếp xúc với tỷ lệ 10:1 của hỗn hợp các axit béo C8, 9, 10 và permethrin. Như có thể được thấy trong Bảng 8, muỗi nhạy permethrin và muỗi kháng permethrin có đáp ứng tương đương nhau khi được cho tiếp xúc

với hỗn hợp này. Cả hai nhóm đều nhạy khi được cho tiếp xúc với hỗn hợp ở tỷ lệ này.

Bảng 8

Phần trăm sống sót của *Aedes aegypti* kháng và nhạy theo thời gian trong Thử nghiệm tại chỗ của C8910 và Permethrin (0,1% và 0,1%)

Chủng	Thời gian (phút trừ khi được lưu ý khác đi)						
	10	20	30	40	50	60	24 giờ
Nhạy	27,7	36,8	6,8	5,7	3,7	3,7	0
Kháng	24,8	20,6	7,0	4,4	1,9	1,44	0

Thử nghiệm tại chỗ #3

Trong Thử nghiệm sinh học này, muỗi kháng pyrethroid và muỗi nhạy pyrethroid được cho tiếp xúc với hỗn hợp theo tỷ lệ 1:1 của hỗn hợp các axit béo C8, 9, 10 và permethrin ở nồng độ 0,1%. Như có thể được thấy trong Bảng 9, muỗi nhạy permethrin và muỗi kháng permethrin có đáp ứng tương đương nhau khi được cho tiếp xúc với hỗn hợp này. Cả hai nhóm đều nhạy khi được cho tiếp xúc với hỗn hợp ở tỷ lệ này.

Bảng 9

Phần trăm sống sót của *Aedes aegypti* kháng và nhạy theo thời gian trong Thử nghiệm tại chỗ của C8910 và Permethrin (1% và 1%)

Chủng	Thời gian (phút trừ khi được lưu ý khác đi)						
	10	20	30	40	50	60	24 giờ
Nhạy	12,3	26,4	27,1	25,0	22,5	20,4	5,9
Kháng	29,6	31,2	27,0	18,6	14,3	12,4	0

Ví dụ 4

Thử nghiệm đường hầm gió

Trong Thử nghiệm sinh học này, thử nghiệm sinh học đường hầm gió chuẩn của WHO được sử dụng bởi CIDEIM. *Aedes aegypti* đã biết là kháng và nhạy với permethrin được sử dụng trong nghiên cứu. Bốn dung dịch được pha chế với các tỷ lệ sau của hỗn hợp các axit béo C8, 9, 10 so với permethrin: 2:1

(0,67% C8910 + 0,33% permethrin); 1:1 (0,5% C8910 + 0,5% permethrin); và 1:2 (0,33% C8910 + 0,67% permethrin). Chế phẩm permethrin 1% được thử nghiệm cũng như hỗn hợp các axit béo C8, 9, 10.

Các dung dịch được pha loãng trong axeton đến 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001%, 0,0001%, và 0,00001%. Sau đó, 0,5 ml mỗi dung dịch pha loãng được phun vào đường hầm gió. Điều này làm phơi nhiễm 20 con muỗi nhốt trong lồng với dịch phun. Mỗi thử nghiệm được lặp lại ba lần. Sau đó, tỷ lệ chết sau 24 giờ được quan sát. Loại thử nghiệm này được mong muốn vì nó thử nghiệm các hợp chất không được phối trộn theo công thức.

Các kết quả của nghiên cứu này cho thấy rằng hỗn hợp theo tỷ lệ 1:1, 1:2 và 2:1 của hỗn hợp các axit béo C8, 9, 10 và permethrin có hiệu quả tiêu diệt muỗi nhạy và muỗi kháng thuốc. Hỗn hợp các axit béo C8, 9, 10 một mình không tạo ra tỷ lệ chết đáng kể trong bất kỳ thử nghiệm nào.

Như dự đoán, muỗi kháng thuốc có tỷ lệ chết thấp hơn so với muỗi nhạy khi tiếp xúc với permethrin. Tuy nhiên, bất ngờ là, số lượng muỗi kháng permethrin bị tiêu diệt bằng hỗn hợp của các axit béo C8, 9, 10 và permethrin là cao hơn.

Nghiên cứu này cho thấy rằng có tác dụng hiệp đồng giữa hỗn hợp các axit béo C8, 9, 10 và permethrin vì các kết quả là lớn hơn tác dụng cộng hợp. Ngoài ra, hỗn hợp chứa hỗn hợp các axit béo C8, 9, 10 với permethrin đạt được tỷ lệ tiêu diệt tương tự như permethrin khi sử dụng ít hơn 33% đến 50% permethrin.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hỗn hợp diệt loài gây hại áp dụng dưới dạng phun vào không gian chứa lượng hữu hiệu của hỗn hợp các axit béo octanoic, nonanoic và decanoic (C8, 9, 10) và lượng hữu hiệu của pyrethroit, trong đó hỗn hợp các axit béo octanoic, nonanoic và decanoic (C8, 9, 10) và pyrethroit có tỷ lệ nằm trong khoảng từ 10:1 đến 1:10 theo khối lượng, và trong đó pyrethroit là permethrin, fenpropathrin hoặc d,d,trans-cyphenothrin.
2. Hỗn hợp diệt loài gây hại theo điểm 1, trong đó hỗn hợp các axit béo octanoic, nonanoic và decanoic (C8, 9, 10) bao gồm khoảng 33% axit béo octanoic, khoảng 33% axit béo nonanoic, và khoảng 33% axit béo decanoic.
3. Hỗn hợp diệt loài gây hại theo điểm 1, trong đó axit béo octanoic, nonanoic và decanoic (C8, 9, 10) và pyrethroit có tỷ lệ là 1:1 hoặc 1:2 theo khối lượng.
4. Phương pháp khống chế côn trùng không nhằm mục đích trị liệu bao gồm bước sử dụng cho môi trường cần khống chế côn trùng lượng hữu hiệu của hỗn hợp theo điểm 1.
5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó môi trường là diện tích ngoài trời cần xử lý diệt côn trùng, cây trồng nông nghiệp, nhà ở hoặc kết cấu hoặc tòa nhà thương mại.
6. Phương pháp theo điểm 4, trong đó động vật chân khớp được khống chế.
7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó động vật chân khớp là muỗi.
8. Phương pháp theo điểm 4, trong đó hỗn hợp tạo ra tác dụng khống chế côn trùng tồn dư.
9. Phương pháp theo điểm 4, trong đó hỗn hợp tạo ra tác dụng tiêu diệt ngay côn trùng bay.
10. Phương pháp theo điểm 4, trong đó côn trùng được khống chế là muỗi, tốt hơn nếu muỗi này là loài *Aedes aegypti* và tốt hơn nếu, muỗi này kháng pyrethroit.

FIG. 1

Đáp ứng thời gian/tỷ lệ chết của *Aedes aegypti* nhạy và kháng đối với Permethrin trong thử nghiệm sinh học sử dụng chai

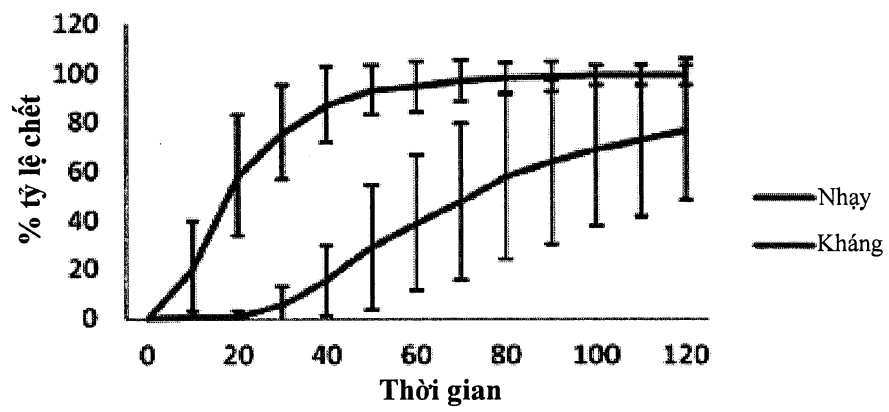


FIG. 2

Đáp ứng thời gian/tỷ lệ chết của *Aedes aegypti* nhạy và kháng đối với C8910 trong thử nghiệm sinh học sử dụng chai

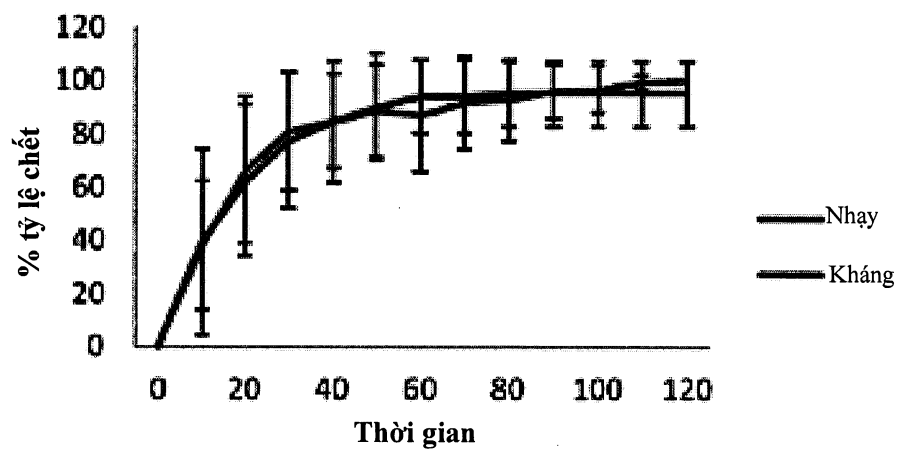


FIG. 3

Đáp ứng thời gian/tỷ lệ chết của *Aedes aegypti* nhạy và kháng đối với tỷ lệ 1:0,01 của C8910 với Permethrin trong thử nghiệm sinh học sử dụng chai

